

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成 13 年度採択研究代表者

佐々木 裕次

((財)高輝度光科学研究センター 主幹研究員)

「X 線 1 分子計測からの *in-vivo* 蛋白質動的構造/機能解析」

## 1. 研究実施の概要

蛋白質分子の動的構造情報/機能相関を詳細に解析するには、原子レベル以下の精度で *in vivo* 動的 1 分子構造情報が安定に得られ、同時に 1 分子機能計測も併用可能な X 線 1 分子計測法が最も有効である。本法を膜蛋白質分子の *in vivo* 計測へ適用し、また本法と計算科学を合体させた全く新しい蛋白質構造決定法を検討する。本研究は敏速な蛋白質分子の構造・機能情報の取得を可能にすることで、医薬利用等とならび 1 分子技術、バイオ技術、そしてナノ技術との融合をも目指す。

本年度達成された研究項目を下記に示す。

- (a) 高圧ナノ結晶作製技術の確立。
- (b) 抗原抗体反応の 1 分子計測における揺らぎと自由エネルギーとの関係考察
- (c) ケージド化合物の可能性検討
- (d) MHC 分子のペプチド認識に関する評価
- (e) 回折スポットの運動シミュレーション
- (f) X 線放射圧の走査型顕微鏡的応用
- (g) 電子線 1 分子追跡法の基礎検討
- (h) *in vitro* K(KcsA)チャネル動的挙動 1 分子計測解析
- (i) 表面近接法を利用した新しい生体高分子構造決定法
- (j) 基板固定による分子運動の変調を確認

## 2. 研究実施内容

(あ) 佐々木 G (関連項目 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j)

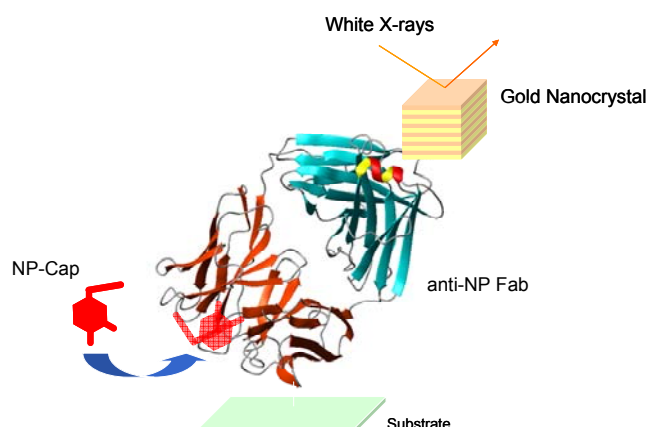
本年度の大きな成果の 1 つは、X 線 1 分子計測法の最重要部分であるナノ結晶の特性が飛躍的に向上し、再現性も極めて良好になった点である。昨年までの研究で、ナノ結晶の結晶性を向上させる最重要因子は、基板である NaCl 基板の清浄性、NaCl 基板への蒸着速度、NaCl への蒸着距離、蒸着時の NaCl 基板の温度、そして再アニーリング時のアルゴン圧力で

あることが判明している。特に蒸着基板への距離に関しては、5 cm 程度にすると蒸着源からの輻射熱の影響で、金のアイランド成長に対する重要な変調を来してしまうが、非常に均一な小さなアイランドを形成する可能性があることが分かった。

また、今年度は昨年までのアルゴン圧力を 0.2MPa から 6.5MPa へと高圧化することに成功したので結晶性が一段と向上した。作製装置を改良することにより、20-30MPa までの高圧下が可能であることも分かったので、高圧条件下のアニーリング方法として全く新しい可能性が開けてきた。これらの成果は、ナノ結晶のオフラインに置ける評価方法が確立したこと起因する。走査電子顕微鏡での評価条件の決定や電子後方散乱回折法 (EBSP) によるナノ結晶内の結晶不整合性 (双晶) の存在を確認できた。特に、後者の EBSP による評価は、今年から本格的に研究が始まった電子線 1 分子追跡法の基本実験と重なるところが大きい。現状の X 線 1 分子計測法の最大の弱点であるマシンタイムの確保 (1 ヶ月で 24 時間程度) を打開できる唯一の解が、ラボレベルの実験法の確立にある。最終年度は溶液セルの形状や装置測定精度の計測等、より具体的な因子決定へと進めたい。

昨年度より始まった抗原抗体反応の 1 分子計測は順調に前進した。これは X 線 1 分子計測法自身の自動測定化や上記にも述べた金のナノ結晶の再現性向上、得られた回折スポットの運動解析を半自動化することに成功したことが影響している。一般に B 細胞の活性化には外来抗原による抗原受容体同士の架橋が必須であるとされている。しかし抗原として考えられる物質には、この架橋構造をとらせることができない物も数多く存在しており、別のシグナル伝達機構も存在すると考えられている。その可能性の一つとして抗原結合による抗体分子の構造変化があげられている。これまでの研究において、抗体分子が抗原と結合することで、抗原結合部位のみならず定常領域にまで構造変化が及んでいることを抗体定常領域に特異的に結合するプロテイン A やプロテイン G をプローブ分子とした Biacore 測定で確認している。しかしながらこの構造変化が具体的にどのようなものであるのかは、不明のままであった。そこで X 線分子計測を用いて抗原結合による抗体分子の揺らぎの変化を計測した。本実験ではマウス抗ニトロフェニル (NP) 抗体 Fab 断片の C<sub>H</sub>1 ドメインと C<sub>L</sub> ドメインとの間で形成されているジスルフィド結合に金ナノ結晶を修飾し定常領域近傍の揺らぎを観測した。その結果、抗原 (NP-Cap) 非存在下では一方向に移動する回折斑点が良く見られるのに対し、抗原存在下では振幅を持った回折斑点が多かった。これは、抗原結合により抗原結合部位のみならず、定常領域の構造もより安定な状態をとっていることを示唆している。最新の解析結果では、アフィニティーの異なる抗原抗体反応における揺らぎ幅と、その際に発生する熱エネルギー (自由エネルギー) の間に正の相関があることが分かってきた。これは抗原抗体反応自身が、揺らぎを制御することを示唆しており、その制御に熱エネルギーが使われているという非常にシンプルな解析結果となり、抗原抗体反応だけではなく、多くの分子認識機構において発生している物理現象であると言えるかもしれない。抗原抗体反応に限らずに、結合の際に反応熱エネルギーの測定しやすい生体分子系を適応して、この関係を明確にすることも含めて今後の展開が期待できる。

ケージド化合物は、多くの時分割測定で利用されてきているが副生成物が生体高分子に悪影響を及ぼす等の欠点もあり、X線 1 分子計測では本格的に利用してこなかった。今年度から本格的な利用を検討し始めた。まだ具体的な成果は得られていないが、数ms レベルの反応時のダイナミクス 1 分子計測が可能である。上記にも述べたが抗原抗体反応が比較的シンプルな運動変化を示すので、この系への利用を皮切りに本格的な実験を来年度にかけて行う予定である。



抗原抗体反応の 1 分子計測における分子配置

本年度よりMHC（主要組織適合遺伝子複合体）の 1 分子揺らぎ変化計測も始めた。抗原抗体反応でB細胞系の実験を行っているので、今後はT細胞系にも触手を伸ばした訳である。インスリン依存性糖尿病(IDDM)を引き起こす要因は、遺伝的に雑多であるが、MHCの関与は最も大きいと考えられている。人及びマウスにおいて IDDM の原因となる MHC 遺伝子座は同定されている。それらに共通する特徴は、 $\beta$ 鎖の 57 番目の残基が Asp 以外のアミノ酸 Ser、Ala 等の中性残基に置き換わっているということである。I-Ag7/DQ8 の X 線結晶解析がなされた結果、他の MHC 分子で顕著な  $\beta$  57 と  $\alpha$  76 の間に水素結合が無く、そのため p9 ポケットの入り口が、やや広がっていることや、p9 ポケットが塩基性であるということが解ったが、それ以外はペプチドの構造を含め、他の I-A 分子とほとんど変わっていない。一方、EAE や IDDM を引き起こす MHC/ペプチドは、単一のペプチドが、複数のランダムな取り合わせの  $V\alpha$  及び  $V\beta$  配列を持つ T 細胞クローンを活性化することが知られている。そこで、我々は MHC の中で一つのペプチドが自由に動き、いくつかの構造をとりうるのではないかという仮説を建てた。それを検証するために、X線 1 分子計測を用いた I-Ag7 或いはそれに結合したペプチドの動きのリアルタイム測定をおこなった。その結果、糖尿病誘起性のペプチドの動きが、コントロールペプチドに比べて大きいことが分かった。この成果はほんの始まりであるが、MHCに関する多くのペプチド群が存在するので、網羅的に計

測を行い直接的とまではいかないもでもペプチド認識の結果である糖尿病への物理的プロセスを解析できたと考えている。

測定されている回折スポットの運動は、実空間ではなくフーリエ空間である。しかし、数式表現としては、ステレオ投影の方が結果的にドミナントに表現される。今年度は、できるだけ簡単な数式でシミュレートするプロトコルを検討した。まだ終了してはいないが、今までの回折スポットの運動の様子から、意外と複雑な運動をする系も現れてきたので、シミュレートできる系を持つことは重要で、早急に簡単なシミュレーターの作製を完成させたい。

意外な発見であったX線放射圧の計測は、1分子レベルに存在するわずかな圧力を計測できるという、X線1分子計測の高感度性を表す典型的な一例として本プロジェクトの中でも極めて重要な成果となった。今後は受け身的に放射圧の計測をするのではなく、この計測を例えばAFM（原子間力顕微鏡）等の短針の先に付けたナノ結晶の力測定に利用できなさを特許化を含めて検討していく。現状のAFMの短針は、pNレベルの検出限界である。X線放射圧はaNであるから、6桁の計測レベル向上が期待できる。ナノ結晶を短針の先に付けるマニピュレートはそう簡単な技術ではないが、極めてインパクトのある測定技術に発展する可能性がある。今後の発展に力を注ぎたい。

#### (い) 老木G（関連項目 h, i）

KcsA チャンネルは放線菌由来の電位非依存性・pH 依存性のカリウムチャンネルである。その立体構造情報は膜貫通ドメインに限られており、細胞内ドメインの構造はEPRを基にした予想構造のみが報告されている。X線1分子計測に先立ち、必要な細胞内ドメインの表面構造情報を得るために、表面近接法を利用した新しい方法を開発した。SH基を持つCys残基をKcsAチャンネルの様々な場所に導入し、Cys残基の平坦面に対する接近し易さ（アクセシビリティ）を測定した。この測定にはSH-Auカップリング反応を利用し、平坦面としてガラス基板上的金薄膜表面を用いた。表面プラズモン共鳴シグナルの変化から定量的にSH-Au反応を評価し、表面露出残基とpH変化に伴う露出性の変化を捉えることに成功した。チャンネル閉状態（pH7.5）と比較して開閉する状態（pH4）では、KcsAチャンネルの細胞質ドメインに比較的大きな構造変化が引き起こされることが示された。

X線1分子計測のプロープであるナノ金結晶はチャンネル分子とCys残基のSH基と結合する。表面近接法によって表面に露出していることが確認されたCys変異体について、変異とその位置への金結晶結合による機能変化を単一チャンネル電流記録により検討した。金結晶結合後も開閉が観測された変異体KcsAチャンネルを基板に倒立固定し、原子間力顕微鏡によって配向を確認した。

KcsAチャンネルがpH依存性であることを利用し、閉状態（pH7.5）と開閉状態（pH4）でX線1分子計測を行った。基板に倒立固定したCys変異体KcsAチャンネルにナノ金結晶を結合させ、金結晶の回折点の運動から分子の運動を推察する。変異体として、細胞質ドメイ

ン先端に Cys 残基を導入したものと、膜貫通ドメイン末端に Cys 残基を導入し、細胞質ドメインを切り落としたものを用いた。いずれの変異体を用いた場合も、閉状態 (pH7.5) では分子の傾斜運動に相当する回折点の運動 (振幅運動) が観測されたのに対し、開閉状態 (pH4) ではチャネル分子が回転対称軸を中心に大きく回転していることを示す回折点の運動 (回転運動) が観測された。さらに、チャネル阻害剤を添加すると、pH4 の測定条件であっても振幅運動のみが観測され、回転運動は観測されないことが分かった。これらの結果は回転運動がチャネルの開閉に伴う運動であり、膜貫通ドメインでの開閉構造変化が細胞内ドメインの末端まで波及していることを示している。チャネル分子の開閉に伴う構造変化を 1 分子レベルで捉えた報告は本研究が初めてである。

今回捉えた回転運動は全く予想されなかったものだが、従来の結晶構造の結果と対応するものであることがあきらかになった。これまでイオン流を遮断する構造 (ゲート) である内部ヘリックス束は、開口に際し各ヘリックスが中心部分でヒンジ折れ曲がり運動をする予想されてきた。ホモ 4 量体を形成し、4 回回転対称性をもつ KcsA チャネルでは、このようなサブユニット内での構造変化が大域的に回転運動となる。

X 線 1 分子計測法による立体構造変化の情報をもとに、目指すものは 1 分子構造機能同時測定である。脂質平面膜に組み込んだ KcsA チャネルに薄い水溶液層を通して放射光を当て、単一チャネル電流と回折点の動きを同時記録するのである。効率のよい実験装置を開発中である。

#### (う) 岡本 G (関連項目 j)

本年度の主な成果を以下にまとめる。まず、1 分子の X 線実験解析のための小ペプチドにおいて拡張アンサンブル法に基づく分子動力学シミュレーションを実行している。 $\alpha$  ヘリックスを形成することが知られている、アミノ酸数 19 の小ペプチドにおいて、拡張アンサンブル法の一つである、レプリカ交換分子動力学法に基づくシミュレーションを実行した。特に、1 分子 X 線実験解析のためにつける金のクラスターの寄与も考慮した。やっと、計算の準備が完了した。現在、1 分子 X 線実験解析のためにつける金のクラスターの質量依存性を詳しく調べる、大規模拡張アンサンブルシミュレーションを実行し、1 分子 X 線測定の際の末端を固定する影響を詳しく調べた。具体的には、ペプチドに何も拘束を与えない場合と、X 線 1 分子計測では固定する N 末端を固定した場合の二つのシミュレーションを行い、N 末端を固定することによる効果について調べた。その結果、まず、いずれのシミュレーションにおいても  $\alpha$  ヘリックスの最安定構造を再現することが出来た。これは、通常のシミュレーションとは異なり、エネルギー局所状態に留まらず、広く構造空間をサンプリングできる拡張アンサンブル法を用いて初めてできることである。次に、主成分解析を用いて、それぞれの条件における自由エネルギー面を構築した。二つのシミュレーションから得られるそれぞれの自由エネルギー面を比較したところ、N 末端を固定することにより、分子の動きが制限されることがわかった。また、Ramachandran plot を解析したとこ

ろ、N末端の固定により局所的に運動が制限されるのではなく、分子全体の動きが制限されることがわかった。

現在、X線1分子計測において分子に結合させる金ナノ結晶の効果についても調べている。このような計算結果を実験の実験結果と直接比較する予定である。

更には、レプリカ交換分子動力学法ばかりでなく、他の強力な拡張アンサンブル法の開発をしてきたが、特に、マルチオーバーラップ法やマルチバーリック・マルチサーマル法の開発を進めている。前者はオーバーラップ空間上のランダムウォーク、後者はエネルギー空間および体積空間上のランダムウォークを実現することにより、シミュレーションがエネルギー極小状態に留まるのを避けることができる。前者では、2つの状態間の遷移状態の情報を温度の関数として調べるができる。また、後者では、任意の温度と圧力におけるアンサンブル平均を計算することができるので、タンパク質の高圧変性について詳しく調べることができる。これらの拡張アンサンブルシミュレーションの結果と実験結果との直接比較も行う予定である。

### 3. 研究実施体制

「佐々木 裕次」グループ

- ①研究分担グループ長：佐々木 裕次（SPring-8/JASRI、主幹研究員）
- ②研究項目：X線1分子計測法の最適化、1分子、ナノ技術、バイオ関連技術の開発  
ミメティック分子の開発

「老木 成稔」グループ

- ①研究分担グループ長：老木 成稔（福井大学、教授）
- ②研究項目：電気生理実験、ミメティック分子設計

「岡本 祐幸」グループ

- ①研究分担グループ長：岡本 祐幸（名古屋大学大学院、教授）
- ②研究項目：計算科学、特に新しい立体構造決定法関連

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- 佐々木裕次（SPring-8/JASRI、JST/CREST）：ナノ結晶をプローブとしたX線1分子計測法：放射光 2005年5月号 第18巻3号
- 佐々木裕次（SPring-8/JASRI、JST/CREST）：X線を用いた1分子計測法：熱測定 Vol.32, No.3 (2005)

- Konno, T., T. Morii, H. Shimizu, S. Oiki, and K. Ikura (福井大学、JST/CREST) :  
Paradoxical inhibition of protein aggregation and precipitation by  
transglutaminase-catalyzed intermolecular cross-linking.:J. Biol. Chem. (2005)
- Ando, H., Kuno, M., Shimizu, H., Muramatsu, I., Oiki, S. (福井大学、JST/CREST) :  
Coupled K<sup>+</sup>-Water Flux through the HERG Potassium Channel Measured by a Osmotic  
Pulse Method.:J. Gen. Physiol. , Volume 126, Number 5, 529-538
- Yuji Sugita<sup>1</sup>, Yuko Okamoto<sup>2</sup> (1: Tokyo Univ., 2: Nagoya Univ., JST/CREST):Molecular  
mechanism for stabilizing a short helical peptide studied by generalized-ensemble  
simulations with explicit solvent :Biophysical Journal, Vol. 88, pp. 3180-3190 (2005)
- Katsumi Murata<sup>1</sup>, Yuji Sugita<sup>2</sup>, Yuko Okamoto<sup>3</sup> (1: Kyoto Univ., 2: Tokyo Univ., 3:  
Nagoya Univ., JST/CREST):Molecular dynamics simulations of DNA dimers based on  
replica-exchange umbrella sampling. I. Test of sampling efficiency :Journal of Theoretical  
and Computational Chemistry, Vol. 4, pp. 411-432 (2005)
- Katsumi Murata<sup>1</sup>, Yuji Sugita<sup>2</sup>, Yuko Okamoto<sup>3</sup> (1: Kyoto Univ., 2: Tokyo Univ., 3:  
Nagoya Univ., JST/CREST):Molecular dynamics simulations of DNA dimers based on  
replica-exchange umbrella sampling. II. Free energy analysis :Journal of Theoretical and  
Computational Chemistry, Vol. 4, pp. 433-448 (2005)
- Koji Yoshida<sup>1</sup>, Toshio Yamaguchi<sup>1</sup>, Yuko Okamoto<sup>2</sup> (1: Fukuoka Univ., 2: Nagoya Univ.,  
JST/CREST):Replica-exchange molecular dynamics simulation of small peptide in water  
and in ethanol :Chemical Physics Letters, Vol. 412, pp. 280-284 (2005)
- Masamichi Nishino<sup>1</sup>, Yuji Sugita<sup>2</sup>, Takao Yoda<sup>3</sup>, Yuko Okamoto<sup>4</sup> (1: Natl Inst. Mater. Sci.  
2: Tokyo Univ., 3: Nagahama Inst. Biosci. Tech., 4: Nagoya Univ., JST/CREST):  
Structures of a peptide fragment of beta2-microglobulin studied by replica-exchange  
molecular dynamics simulations - towards the understanding of the mechanism of amyloid  
formation:FEBS Letters, Vol. 579, pp. 5425-5429 (2005)
- Yukio Kawashima<sup>1</sup>, Yuji Sugita<sup>2</sup>, Takao Yoda<sup>3</sup>, Yuko Okamoto<sup>1</sup> (1: Nagoya Univ.,  
JST/CREST 2: Tokyo Univ., 3: Nagahama Inst. Biosci. Tech. ):Effects of the fixed end in  
single-molecule imaging techniques: A replica-exchange molecular dynamics study :  
Chemical Physics Letters, Vol. 414, pp. 449-455 (2005)
- Hisashi Okumura<sup>1</sup>, Yuko Okamoto<sup>2</sup> (1:Inst. Mol. Sci./GUAS, 2: Nagoya Univ.,  
JST/CREST):Effects of the fixed end in single-molecule imaging techniques: A  
replica-exchange molecular dynamics study :Journal of Computational Chemistry, Vol. 27,  
pp. 379-395 (2006)
- Satoru G. Itoh<sup>1</sup>, Yuko Okamoto<sup>2</sup> (1:Nagoya Univ., NAREGI, 2: Nagoya Univ.,  
JST/CREST):Theoretical studies of transition states by the multi-overlap molecular  
dynamics methods:Journal of Chemical Physics, Vol. 124, 104103 (14 pages) (2006)

- 佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST):高質ナノ結晶作製で実現したX線1分子計測:日本結晶学会誌:Vol.47 No.5,354-360(2005)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数: 0 件 (CREST 研究期間累積件数: 2 件)